

## METHODS OF SCREENING FOR ANTIBODY LIGHT CHAINS

Technical Field

The present invention relates to methods of screening for high-affinity light chains  
5 which correspond to, and are commonly shared by, heavy chains having different specificities for  
a multi-specific antibody.

Background Art

Bispecific antibodies (BsAbs), also called bifunctional antibodies, are multivalent  
10 antibodies with specific binding sites for two antigenic determinants and which can react with  
two types of antigens. BsAbs can be produced using hybrid hybridomas, or more specifically,  
quadromas which are fusions of two different types of monoclonal antibody-producing cells  
(U.S. Patent No. 4,474,893; R. Bos and W. Nieuwenhuizen (1992) *Hybridoma* 11(1): 41-51).  
BsAbs can also be generated by linking Fab (antigen-binding) fragments or Fab' fragments of  
15 two types of monoclonal antibodies, using chemical techniques (M. Brennan *et al.* (1985)  
*Science* 229(1708): 81-3) or by genetic engineering. In addition, BsAbs can be produced by  
covalently linking two complete monoclonal antibodies (B. Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.*  
160(6): 1686-701).

Problems underlying BsAb production methods include the possibility of generating ten  
20 different types of antibody molecules due to random combination of immunoglobulin heavy  
chains and light chains (M.R. Suresh *et al.* (1986) *Methods Enzymol.* 121: 210-28). Among the  
ten types of antibodies produced by quadromas, the only antibody that has the desired dual  
specificity is the one that has the correct light and heavy chain combination and which is  
composed of two light chain/heavy chain pairs having different binding specificities. Therefore,  
25 the antibody having the desired dual specificity must be selectively purified from the ten types of  
antibodies produced by quadromas. Purification is generally performed using affinity  
chromatography, but this method is laborious and has low yields (Y.S. Massimo *et al.* (1997) *J.*  
*Immunol. Methods* 201: 57-66).

Methods that overcome such problems and give higher BsAb yields include, for  
30 example, methods of chemically linking antibody fragments such as Fab'-thionitrobenzoic acid  
derivative and Fab'-thiol (SH) (Brennan *et al.* (1985) *Science* 229: 81). Furthermore, methods  
for more conveniently obtaining chemically linkable Fab'-SH fragments include methods for  
producing these fragments from hosts such as *E. coli* using genetic recombination techniques  
(Shalaby *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 175: 217-25). Genetic recombination techniques can also  
35 be used to obtain BsAbs composed of humanized antibody fragments. Diabodies (Db) are  
BsAbs constructed from gene fusion of two types of fragments, and comprise a light chain

variable region (VL) connected to a heavy chain variable region (VH) by a linker that is too short to allow pairing between them (P. Holliner *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8; EP No. 404,097; WO93/11161). An example of such a Db that has been further improved is single-chain Db (Japanese Patent Application No. 2002-112369). However, antibody fragments  
5 have a shorter serum half-life when compared to full-length antibodies, and do not have effector functions as complete antibodies do. Therefore, in some cases, full-length antibodies are more suitable for diagnosis and therapy.

Methods for efficiently linking generated antibody heavy chains into heterodimers include the method for introducing a sterically complementary mutation into the CH3 domain (a  
10 portion of the constant region) in the multimerized domain of an antibody heavy chain (Ridgway *et al.* (1996) Protein Eng. 9: 617-21). Heavy chains produced by this method may still form pairs with the wrong light chains. Patent Document 1 describes a method for generating multi-specific antibodies which share common light chains with heteromeric polypeptides having antibody-binding domains, and bind to these polypeptides.

15 BsAbs having specific binding capacities for two different antigens are useful as targeting agents in clinical fields such as *in vitro* and *in vivo* immunodiagnosis, therapy, and immunoassay. For example, they can be used as vehicles to link enzymes to carriers by designing a BsAb so that one of its arms binds to an epitope of an enzyme reaction non-inhibiting portion of an enzyme to be used in an enzyme immunoassay, and the other arm  
20 binds to a carrier for immobilization (Hammerling *et al.* (1968) J. Exp. Med. 128: 1461-73). Another example is antibody-targeted thrombolytic therapy. This therapy examines the use of antibodies that transport enzymes such as urokinase, streptokinase, tissue plasminogen activator, prourokinase, and such, and their precursor proteins, in a manner specific to fibrin in thrombi (T. Kurokawa *et al.* (1989) Bio/Technology 7: 1163; Unexamined Published Japanese Patent  
25 Application No. (JP-A) Hei5-304992). Furthermore, uses of BsAbs have been reported as potential mouse/human-chimeric bispecific antibodies for cancer targeting (JP-A Hei2-145187), and in cancer therapy and diagnosis for various tumors (see for example, JP-A Hei5-213775; JP-A Hei10-165184; JP-A Hei11-71288; Published Japanese Translation of International Publication No. 2002-518041; Published Japanese Translation of International Publication No.  
30 Hei11-506310; Link *et al.* (1993) Blood 81: 3343; T. Nitta *et al.* (1990) Lancet 335: 368-71; L. deLeij *et al.* (1990) Foundation Nationale de Transfusion Sanguine, Les Ulis France 249-53; Le Doussal *et al.* (1993) J. Nucl. Med. 34: 1662-71; Stickney *et al.* (1991) Cancer Res. 51: 6650-5), mycotic therapy (JP-A Hei5-199894), immune response induction (Published Japanese Translation of International Publication Hei10-511085; Weiner *et al.* (1993) Cancer Res. 53:  
35 94-100), induction of killer T-cell function (Kroesen *et al.* (1994) Br. J. Cancer 70: 652-61; Weiner *et al.* (1994) J. Immunol. 152: 2385), immunoanalysis (M.R. Suresh *et al.* (1986) Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 83: 7989-93; JP-A Hei5-184383), immunohistochemistry (C.Milstein and A.C.Cuello (1983) Nature 305: 537), and such.

Specific antibodies for a given antigen can be produced via genetic engineering, by obtaining the nucleotide sequences of heavy and light chain variable regions which determine the antigen specificity of antibodies (J. Xiang *et al.* (1990) Mol. Immunol. 27: 809; C.R. Bebbington *et al.* (1992) Bio/Technology 10: 169). Methods for obtaining antigen-specific heavy chains and light chains include methods that utilize phages or phagemids using *E. coli* as the host (W.D. Huse *et al.* (1989) Science 246: 1275; J. McCafferty *et al.* (1990) Nature 348: 552; A.S. Kang *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4363). In these methods, antibody libraries are constructed by generating Fabs, or by generating fusion proteins between a phage coat protein and Fab or single-strand Fv. Finally, antigenic affinity is examined to select antigen-specific antibodies and their genes from these antibody libraries.

[Patent Document 1] Published Japanese Translation of International Publication No. 2001-523971

#### Disclosure of the Invention

In generating a bispecific IgG, two antibodies against different antigens are selected, and the two heavy chain genes and two light chain genes are introduced into cells, which gives rise to ten different combinations as mentioned in the Background Art. Patent Document 1 proposes developing a method for preferentially expressing a heteromeric combination of heavy chains by introducing an amino acid substitution at the CH3 portion of IgG, and efficiently expressing a bispecific IgG through the use of a commonly shared light chain. However, when two antibodies are randomly selected, the probability that they possess the same light chain is low, which makes it difficult to practice the above-mentioned idea. The present invention provides methods of screening for high-affinity light chains which correspond to arbitrary and different heavy chains, and which are commonly shared by the heavy chains.

The present inventors completed this invention by discovering that, light chains with high antigenic affinity which correspond to, and are commonly shared by, different heavy chains that can be used to generate a BsAb, can be obtained by repeating the steps of: (1) individually selecting antibody A against antigen A and antibody B against antigen B; (2) introducing expression vectors carrying genes that encode the heavy chains (preferably the Fd portion, or more specifically, the region comprising VH and CH1) of the antibodies and preparing a secretory cell line for each heavy chain: Ha (which secretes the antibody A heavy chain) and Hb (which secretes the antibody B heavy chain); (3) separately constructing a library comprising light chains expressed as fusion proteins with phage surface proteins; (4) introducing the light chain library into the *E. coli* Ha above, for secretion of a phage library that presents on their

surfaces antibodies comprising the antibody A heavy chain and various light chains (Fab when the heavy chain is the Fd portion) (Fig. 1); (5) concentrating clones from the library by panning using antigen A; (6) infecting *E. coli* Hb with the obtained clones, and obtaining a phage library that displays on their surfaces antibodies comprising the antibody B heavy chain and various light chains (Fab when the heavy chain is the Fd portion); and (7) concentrating library clones by panning with antigen B (Fig. 2).

More specifically, the present invention relates to the following:

(1) A method of screening for commonly shared light chains, wherein the method comprises the steps of:

- 10 (a) generating a host secreting the heavy chain of an antibody that binds to a desired antigen;
- (b) introducing an antibody light chain library into the host of step (a) to cause secretion of phage libraries presenting antibodies composed of the heavy chain and the light chains;
- (c) selecting a phage library that displays antibodies that bind specifically to the desired antigen of step (a);
- 15 (d) introducing the phage library selected in step (c) into a host secreting the heavy chain of an antibody that binds to a desired antigen different from the antigen of step (a) to cause secretion of phage libraries presenting antibodies composed of the heavy chains and light chains; and
- 20 (e) selecting a phage library that displays antibodies that bind specifically to the desired antigen of step (d).

(2) A method of screening for commonly shared light chains, wherein the method comprises the steps of:

- 25 (a) generating a host secreting the heavy chain of an antibody that binds to a desired antigen;
- (b) introducing an antibody light chain library into the host of step (a) to cause secretion of phage libraries presenting antibodies composed of the heavy chain and the light chains;
- (c) selecting a phage library that displays antibodies that bind specifically to the desired antigen of step (a);
- 30 (d) introducing the phage library selected in step (c) into a host secreting a heavy chain comprising an amino acid sequence different from that of the heavy chain of step (a) to cause secretion of phage libraries that display antibodies composed of the heavy chains and light chains; and
- (e) selecting a phage library that displays antibodies that bind specifically to the antigen
- 35 recognized by the heavy chain of step (d).

(3) The method of (1) or (2), wherein the antibody heavy chain is Fd and the antibody

composed of said heavy chains and light chains is Fab.

4. The method of (1) or (2), wherein the host is *E. coli*.

5. The method of (1) or (2), wherein steps (b) to (e) are repeated twice or more.

6. The method of (1), wherein the method further comprises the following steps of:

5 (f) introducing the phage library selected in step (e) into a host secreting the heavy chain of an antibody that binds to a desired antigen different from the antigens of steps (a) and (d) to cause secretion of phage libraries that display antibodies composed of the heavy chains and light chains; and

10 (g) selecting a phage library that displays antibodies that bind specifically to the desired antigen of step (f).

7. The method of (2), wherein the method further comprises the following steps of:

(f) introducing the phage library selected in step (e) into a host secreting a heavy chain comprising an amino acid sequence different from those of the heavy chains of steps (a) and (d) to cause secretion of phage libraries that display antibodies composed of the heavy chains and  
15 light chains; and

(g) selecting a phage library that displays antibodies that bind specifically to the antigen recognized by the heavy chain of step (f).

8. A light chain obtained by the method of any one of (1) to (7).

9. An antibody comprising the light chain of (8).

20 10. A method for generating antibody light chains, wherein the method comprises the steps of:

(a) selecting an antibody light chain from the screening method of any one of claims 1 to 7;

(b) generating a vector capable of expressing the selected light chain based on its genetic sequence;

25 (c) introducing the vector into a host cell; and

(d) culturing said host cell.

11. A host that is infected with a phage capable of presenting a light chain and comprises a vector capable of expressing a heavy chain.

30 12. An *E. coli* that is infected with a phage capable of presenting a light chain and comprises a vector capable of expressing a heavy chain.

The present invention relates to methods of screening for common light chains, in which the method comprises the steps of: (a) generating a host that secretes a heavy chain of an antibody which binds to a desired antigen; (b) introducing an antibody light chain library into the  
35 host of step (a) to generate libraries displaying antibodies composed of the heavy chain and the light chains above; (c) selecting a library which displays antibodies that bind specifically to the

desired antigen described in step (a); (d) introducing the library selected in (c) into a host that secretes the heavy chain of an antibody which binds to a desired antigen different from the antigen of step (a) to generate a library that presents antibodies composed of the heavy chains and the light chains; and (e) selecting a library that presents antibodies which bind specifically to the desired antigen described in step (d). The methods of the present invention can be used to select commonly shared light chains that show high antigenic affinity and correspond to different heavy chains, particularly those that may be used to generate BsAbs. However, in the methods of the present invention, by repeating steps (b) and (c), or steps (b) to (e) using hosts that secrete different types of heavy chains and their corresponding antigens, one can screen for commonly shared light chains that correspond to a greater number of heavy chains and show high antigenic affinity, which can be used to produce not only BsAbs, but also multi-specific antibodies with specificity for three or more antigens. The multi-specific antibodies disclosed in this specification are antibodies that bind specifically to at least two types of different antigens. A preferred example of the multi-specific antibodies is a BsAb that can specifically bind to two antigens.

In the present invention, the term "different antigens" does not necessarily mean that the antigens themselves are different, and include cases where the antigenic determinants are different. Therefore, for example, different antigenic determinants within a single molecule are also included in the "different antigens" of the present invention. Two antibodies that each recognizes a different antigenic determinant within a single molecule are treated as antibodies recognizing different antigens in the present invention. Furthermore, the term "commonly shared light chain" in this invention refers to a light chain that associates with two or more different types of heavy chains, and may have a binding capacity for each of the antigens. Herein, "different heavy chains" refers to preferably heavy chains of antibodies against different antigens, but is not limited thereto, and also means heavy chains with amino acid sequences different from each other. Therefore, the present invention also relates to methods of screening for common light chains, wherein the method comprises the steps of (a) generating a host that secretes the heavy chain of an antibody which binds to a desired antigen, (b) introducing an antibody light chain library into the host of step (a) to generate libraries displaying antibodies composed of the heavy chain and light chains above, (c) selecting a library that presents antibodies which specifically bind to the desired antigen of step (a), (d) introducing the library selected in step (c) into a host which secretes a heavy chain having an amino acid sequence different from that of the heavy chain of step (a), and secreting a phage library that presents antibodies composed of the heavy chains and light chains, and (e) selecting a phage library that presents antibodies which specifically bind to the antigen recognized by the heavy chains of step (d).

The present invention relates to methods of screening for commonly shared light chains which correspond to two or more types of different antibody heavy chains and have high antigenic affinity. In the screening methods of the present invention, hosts which secrete heavy chains of antibodies that bind to desired antigens must be obtained first. Two types of hosts  
5 that each secretes a heavy chain corresponding to one of the two types of desired antigens are necessary for generating a BsAb, three types are necessary for a tri-specific antibody, and four types are necessary for a tetra-specific antibody. The following description will focus on examples of methods for screening commonly shared heavy chains in BsAbs.

To obtain hosts that secrete antibody heavy chains necessary for the screening of this  
10 invention, antibodies against two types of antigens (called antigen A and antigen B for convenience) were selected, and cells producing them were obtained. In the description that follows, an antibody against antigen A is called antibody A, and an antibody against antigen B is called antibody B. These antibody-producing cells can be obtained by immunizing animals using appropriate sensitizing antigens. Alternatively, antibody-producing cells can be prepared  
15 by *in vitro* immunization of lymphocytes that can produce antibodies. Various mammals can be used as the immunizing animals, and primates and animals of Rodentia and Lagomorpha are generally used. Examples of such animals include mice, rats, and hamsters for Rodentia, rabbits for Lagomorpha, and monkeys including the cynomolgus monkey, rhesus monkey, hamadryas, and chimpanzees for primates. In addition, transgenic animals carrying human  
20 antibody gene repertoires are known, and human antibodies can be obtained by using such animals (see, WO96/34096; Mendez *et al.* (1997) Nat. Genet. 15: 146-56).

Animal immunization can be carried out by appropriately diluting and suspending a sensitizing antigen in Phosphate-Buffered Saline (PBS), physiological saline, or such, and forming an emulsion by mixing an adjuvant as necessary, followed by intraperitoneal or  
25 subcutaneous injection into animals. After that, the sensitizing antigen mixed with Freund's incomplete adjuvant is preferably administered several times every 4 to 21 days. Antibody production can be confirmed by measuring the target antibody titer in animal sera using conventional methods.

Both complete antibodies having immunogenicity and incomplete antigens (including  
30 haptens) having no immunogenicity may be used as antigens for immunizing animals. For example, substances comprising proteins, polypeptides, oligosaccharides, nucleic acids, lipids, or such may be used as antigens. Immunogens used to immunize animals can be made into soluble antigens by linking the molecules serving as antigens to other molecules (for example, keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine cycloglobulin, soybean trypsin inhibitor, and  
35 such) as necessary. Furthermore, in some cases, fragments of a soluble antigen can be used as immunogens. When transmembrane molecules such as receptors are used as an antigen,

preferably a fragment thereof is used (for example, the extracellular region of a receptor). Furthermore, cells expressing transmembrane molecules on cell surfaces may be used as immunogens. Such cells can be found in nature (tumor cell lines and such), or prepared using genetic recombination techniques.

5           The methods of the present invention for selecting commonly shared light chains can be applied to the generation of BsAbs against various antigens. For example, when the objective is to use BsAbs for cancer therapy, one of the arms of the antibody is prepared so as to recognize tumor cell antigens, and the other arm can be designed to recognize a molecule that results in cytotoxicity. Examples of tumor cell antigens are 1D10 (malignant B cells), AMOC-1 (pan  
10   carcinoma associated antigen), CAMA1, CD7, CD15, CD19, CD22, CD38, CEA, EGF receptor, Id-1, l-D1 (colon cancer), MoV18, p97, p185<sup>HER2</sup>, OVCAR-3, neural cell adhesion molecule (NCAM), renal cell carcinoma, melanocyte stimulating hormone analog, and folic acid binding protein (FBP). Examples of molecules that result in cytotoxicity are CD3, CD16, and FcγRI. In addition, BsAbs can be designed so that they can bind IFN-α, saponin, vinca alkaloid, and  
15   toxins such as the A chain of ricin.

Furthermore, by constructing a BsAb in such a way that it binds to receptors (for example, various cytokine receptors) which upon ligand binding, transmit signals into cells by forming a heterodimer and changing the interchain distance, angle, and such, the BsAb can be utilized as an agonistic antibody to mimic receptor dimerization by ligands.

20           In addition, known BsAbs include (1) BsAbs which bind to CD30 and alkaline phosphatase to interact with enzymes that assist the conversion of chemical substances such as mitomycin phosphate into mitomycin alcohol, (2) BsAbs which bind to fibrin, tPA, uPA, and such and which can be used as fibrinolytic agents, (3) BsAbs which bind to LDL and Fc receptors (FcγRI, FcγRII, or FcγRIII), and such to guide immune complexes to cell surface  
25   receptors, (4) BsAbs which recognize antigens on T cells such as CD3, and antigens of pathogens such as HCV, influenza, and HIV, and which can be used for infectious diseases (5) BsAbs which have affinity towards tumor antigens that can be used to detect tumors, and towards detectable substances such as EOTUBE, DPTA, and hapten, (6) BsAbs which may be used as vaccine adjuvants (see, Fanger *et al.* (1992) Crit. Rev. Immunol. 12: 101-24), and (7)  
30   BsAbs against antigens which are detectable substances that may be used for diagnosis, such as rabbit IgG, horseradish peroxidase (HRP), FITC, and β-galactosidase, and hormone, ferritin, somatostatin, substance P, CEA, and such. The methods of the present invention for selecting commonly shared light chains can be used to generate various multi-specific antibodies including these known BsAbs (see WO89/02922 pamphlet, EP314, 317 publication, and  
35   US5116964 publication).

Next, antibody-producing cells obtained from lymphocytes or animals immunized with



a desired antigen can be fused with myeloma cells to generate hybridomas using conventional fusing agents, for example, polyethylene glycol (Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 59-103). When needed, hybridoma cells are cultured and grown, and the binding specificity of the antibody produced from these hybridomas is  
5 analyzed using known methods such as immunoprecipitation, radioimmunoassay (RIA), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Thereafter, hybridomas that produce antibodies of interest whose specificity, affinity, or activity has been determined can be subcloned by methods such as limiting dilution when needed.

Next, genes encoding the heavy chains of selected antibodies A and B are cloned from  
10 hybridomas or antibody-producing cells (sensitized lymphocytes, and such) using probes that may bind specifically to the heavy chains (for example, oligonucleotides complementary to sequences encoding the antibody constant regions). Cloning from mRNA using RT-PCR is also possible. Immunoglobulins are classified into five different classes, IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, which are further divided into several subclasses (isotypes) (for example, IgG-1, IgG-2,  
15 IgG-3, and IgG-4; IgA-1 and IgA-2; and such). The antibody heavy chains used in the present invention are not particularly limited and may belong to any of these classes or subclasses. However, IgG is particularly preferred.

Genes encoding antibodies or antibody fragments of interest can be obtained from antibody libraries rather than the hybridomas described above, by utilizing affinity for desired  
20 antigens. Construction of antibody libraries is well known, and they can be produced and used according to various methods. For example, for antibody phage libraries, one can refer to references such as Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-8, Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-97, Waterhouses *et al.* (1993) *Nucleic Acids Res.* 21: 2265-6, Griffiths *et al.* (1994) *EMBO J.* 13: 3245-60, Vaughan *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 309-14, and Published  
25 Japanese Translation of International Publication No. Hei10-504970. In addition, known methods, such as methods which use eukaryotic cells as the library (WO95/15393 pamphlet), and the ribosome display method may be used.

Herein, it is possible to modify heavy chain-encoding genes by genetic engineering techniques. The technology of producing "humanized antibodies" by substituting portions of a  
30 monoclonal antibody derived from non-human mammals (mice, rats, hamsters, etc.) other than the CDR (complementarity determining region), with sequences of the framework structure of variable regions derived from human immunoglobulins by genetic engineering techniques is known (see for example, Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-5; Reichmann *et al.* (1988) *Nature* 332: 323-9; Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-6). The humanized antibody may  
35 contain amino acid residues not included in the CDR or the framework structure sequences incorporated into the recipient antibody. Generally, such amino acid residues are introduced to

optimize proper antigen recognition and/or binding capacity of antibodies. Heavy chains used in the screening methods of the present invention may be modified by humanization as such.

Besides the humanization described above, antibodies may be modified to improve their biological characteristics, for example, antigenic affinity. Such modifications can be made using methods such as site-directed mutagenesis (see for example, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488), PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis. In general, mutant antibodies whose biological characteristics have been improved show amino acid sequence homology and/or similarity of 70% or higher, more preferably 80% or higher, and even more preferably 90% or higher (for example, 95% or higher, 97%, 98%, 99%, etc.), when compared to the amino acid sequence of the original antibody heavy chain variable region. In the present specification, sequence homology and/or similarity is defined as the ratio of amino acid residues that are homologous (same residue) or similar (amino acid residues classified into the same group based on the general characteristics of amino acid side chains) to the original antibody residues, after the sequence homology value has been maximized by aligning sequences and introducing gaps as necessary. Generally, naturally-occurring amino acid residues are classified into groups based on the characteristics of their side chains: (1) hydrophobic: alanine, isoleucine, norleucine, valine, methionine, and leucine; (2) neutral hydrophilic: asparagine, glutamine, cysteine, threonine, and serine; (3) acidic: aspartic acid, and glutamic acid; (4) basic: arginine, histidine, and lysine; (5) residues that affect the orientation of the chains: glycine, and proline; and (6) aromatic: tyrosine, tryptophan, and phenylalanine.

Host cells that secrete antibody heavy chains used in the methods of the present invention may be those that secrete full-length antibody heavy chains, or those that secrete partial fragments of the heavy chains. Therefore, the heavy chains of the present invention comprise full-length antibody heavy chains and heavy chain fragments. The heavy chain fragments are not particularly limited, and preferably comprise a heavy chain variable region. It is particularly preferred that they comprise an Fd portion (heavy chain variable region VH and constant region CH1). However, without particular limitation to those described above, the host cells may be constructed to secrete only the heavy chain variable region, a portion of the variable region, or a portion containing other regions of the constant region (CH2 and 3).

A gene portion that encodes a desired antibody heavy chain is introduced into an expression vector that is suitable for expression in appropriate host cells. In the methods of the present invention, host cells that secrete heavy chains are not particularly limited, and are preferably bacteria that can be infected by phages, particularly gram negative bacteria. Among them, *E. coli* that express the F-factor are preferred. An example of *E. coli* that express the F-factor is XL1-Blue.

In the methods of the present invention, particularly preferred vectors for expressing

heavy chains in *E. coli* must comprise units such as promoters and terminators, which regulate the transcription and translation of genetic information. For example, pBR and pUC-type plasmids can be used as the plasmid vector. Promoters such as lac, trp, tac, and those derived from  $\lambda$  phage PL and PR may be utilized as the promoter. Terminators derived from trpA, phages, and rrnB ribosomal RNA can be used as the terminator.

The constructed expression vectors are introduced into host cells, and strains that secrete antibody heavy chains are obtained. The expression vectors may be introduced into host cells using methods such as those that utilize calcium ions (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110 (1972)), protoplast methods (JP-A Sho 63-24829), and electroporation methods (Gene 17: 107 (1982); Molecular & General Genetics 168: 111 (1979)).

In the screening methods of the present invention, the subject of screening, a pool of antibody light chains, is preferably in the form of a phage library when bacterial cells are selected as the host cell for secretion of heavy chains. For light chain-encoding genes, populations of genes obtained by amplifying RNA derived from substances prepared from peripheral blood monocytes, bone marrow, or spleen of humans or other animals, using methods such as reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), synthesized DNA, and such, may be used. In addition, methods for increasing the diversity of an antibody library by inducing mutations in the antibody CDR region are also known (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 10-504970). A library of antibody light chain genes with its diversity increased by such methods can be used as a pool of light chain-encoding genes in the screening methods of the present invention. The light chains of the present invention comprise full-length light chains and partial fragments of light chains. The light chain fragments are not particularly limited, and are preferably fragments comprising the light chain variable region VL.

Generally, to generate a phage library, light chain-encoding DNAs are incorporated into appropriate phage vectors, so that the light chains will be displayed on the external surface of the phages, as fusion proteins with coat proteins or display anchor proteins. Herein, there are no particular limitations on the phage vectors. Generally, they are vectors that contain a bacteriophage replication origin (ori), and are induced through modifications of the phage genome. Phage vectors preferably encode, in the direction from N to C terminus, (1) a light chain, and (2) a phage membrane anchor domain (all or a portion of a coat protein or display anchor protein). Furthermore, a sequence encoding the prokaryotic cell secretion signal domain, which enables proteins encoded by the above-mentioned (1) and (2) to be secreted to the outside of host bacterial cells and incorporated into bacteriophages, is placed before the sequence encoding the light chain of (1), as necessary.

A phage membrane anchor domain for displaying light chains on the surface of phage

particles is an entire coat protein or display anchor protein, or a portion thereof, which can bind to the outer membrane of a filamentous phage particle and therefore allow fusion proteins to be incorporated. Coat proteins or display anchor proteins are proteins that coat mature phage particles, and can be exemplified by the major phage particle coat protein cpVIII, minor coat proteins such as cpVI, cpVII, and cpIX, and infection-related adsorption protein cpIII.

Expression as a fusion protein with the cpIII or cpVIII protein is particularly preferred, and of these, the expression of the fusion proteins formed with cpIII is well studied (see, Smith (1985) Science 228: 1315-7; de la Cruz *et al.* (1988) J. Biol. Chem. 263: 4318-22). The membrane anchor domain comprises a portion of the C-terminal region of a protein coating these mature phage particles, in other words, are a region of hydrophobic amino acid residues for penetrating lipid bilayer membranes, and a region of charged amino acid residues in the cytoplasmic region.

Secretion signals can be any leader peptide sequence that enables secretion of fusion proteins from host cells; one such example being the pel1B secretion signal (see, Better *et al.* (1988) Science 240: 1041-3; Sastry *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5728).

Generally, phage genome sequences necessary for the production of phage particles are removed or inactivated in the phage vectors mentioned above. Therefore, to produce phage particles via infection of host cells with the phage vectors, helper phages are generally required. Helper phages are used to infect cells comprising defective phages or phage vectors, and have a function of complementing defective phages or phage vectors.

There are no particular limitations on the phage particles that constitute the phage libraries, and for example, known phages such as Charon4A, Charon30, f1, f2, fd, G4, If1, Ike, M13, MS2, P1, P2, P4, Pfl, Pf3, T4, T7, Xf,  $\lambda$ ,  $\lambda$ B,  $\lambda$ gWES,  $\Phi$ K, and  $\Phi$ X174, may be utilized, and filamentous phages such as fd, f1, and M13 are preferred. Every library phage particle produced in this manner comprises a copy of its corresponding phagemid, which encodes the light chain fusion protein presented on the particle surface. Therefore, genes encoding light chains that associate with the antibody A heavy chain and have binding capacity for antigen A can be obtained, by contacting the antibody A heavy chain with a light chain-presenting phage library, and separating phage particles based on their antigen A-binding capacity, where the heavy chain is bound to the light chain fusion protein presented on the phage particle.

For example, a vector comprising the f1 phage ori is used to construct a library in which light chains (for example, those comprising VL and CL) are expressed as fusion proteins with the f1 phage gene 3 protein (minor coat protein). This light chain library is introduced into the aforementioned *E. coli* host which expresses an antibody A heavy chain (for example, Fd), and by infecting the host with helper phages, a phage library, which presents on their surfaces antibodies comprising an antibody A heavy chain and various light chains (Fab when the heavy chain is Fd and the light chain comprises VL and CL) as fusion proteins with the gene 3 protein,

can be secreted from *E. coli* (Fig. 1).

WO95/15393 also proposes construction of antibody libraries using eukaryotic cells, which allows more accurate investigation of the actual antigen-binding capacity of antibodies from the screening stage. Therefore, in place of bacterial hosts such as *E. coli*, the methods of the present invention can also employ antibody libraries from eukaryotic cells that present  
5 antibodies on their cell surfaces. More specifically, an expression vector carrying a gene that encodes a desired heavy chain (for example, Fd), and is linked downstream of a promoter appropriate for its expression and a signal sequence which enables the secretion of the heavy chain, is introduced into eukaryotic host cells. Furthermore, expression vectors are constructed  
10 with light chain-encoding genes linked to a transmembrane region-encoding sequence and inserted downstream of an appropriate promoter, so that the light chains will be displayed on cell surfaces when expressed. The transmembrane region is preferably added to the C terminus of expressed light chains. By introducing light chain expression vectors into the aforementioned heavy chain-secreting host cells, host cells which express on their cell surfaces antibodies that  
15 bind to a desired antigen can be selected. The displayed antibody is a Fab fragment when Fd is used as the heavy chain and those comprising VL and CL are used as the light chains.

There are no particular limitations as to the type of host cell used, but when the objective is to screen antibodies with accurate antigen specificity, the use of eukaryotic cells, particularly animal cells, is preferred. Even more preferable are mammalian cells. Examples  
20 include 3T3, BHK, Bowes melanoma, C127, CHO (J. Exp. Med. 108: 945 (1995); Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968)), COS, HEK, Hela, KJM, Namalwa, and myeloma cells. Vectors for expressing heavy chains and light chains can be any vector suitable for expression in the host of choice, which can be constructed using pUC18 and such. A heavy chain-encoding gene can be incorporated into a genome using well-known  
25 techniques. Expression vectors are introduced into host cells by conventional methods such as electroporation (Chu *et al.* (1987) Nucleic Acids Res. 15: 1311-26), the cationic liposome method, direct injection (microinjection), electroporation (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons (1987) Section 9.1-9.9), lipofection ((Derijard (1994) Cell 7: 11025-37), the calcium phosphate method (Chen and Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7:  
30 2745-52), and the DEAE dextran method (Lopata *et al.* (1984) Nucleic Acids Res. 12: 5707-17; Sussmann and Milman (1985) Mol. Cell. Biol. 4: 1642-3).

Next, in the screening methods of the present invention, host cells that present antibodies produced as described above are selected based on their affinity for antigen A. When bacterial cells are selected as the host and light chain-encoding genes as the phage library,  
35 antibodies are secreted from host cells as phage libraries. Therefore, panning with antigen A directed against antibody A enables concentration of clones that bind to antigen A from the host

cell-secreted phage library. In this case, the concentrated phage library of interest can be directly used in the subsequent step of infecting host cells, and is therefore particularly convenient. When the phage library is not secreted, but is in the form of antibodies presented on the host cell surface, expression vectors harboring light chains that constitute the desired antibodies are collected from cells presenting these antibodies, and purified by known techniques as necessary and used in the following step.

Next in the screening methods of the present invention, the clones concentrated as above, or light chain expression vectors that have been recovered, are introduced or used to infect host cells that secrete the antibody (for example, Fd) of antibody B. When using a phage library, by heavily infecting these host cells with helper phages, a phage library that presents on its surface antibodies comprising an antibody B heavy chain such as Fd and various light chains, is secreted (Fab when Fd and light chains comprising VL and CL are used). When expression vectors other than phage vectors are used, various cells which present on their surfaces antibodies comprising a heavy chain (for example, Fd) and antibody B light chains are obtained (Fab when Fd and light chains comprising VL and CL are used).

Next, similarly to the selection against antigen A, when a phage library is used, clones that bind to antigen B are concentrated from the host cell-secreted phage library by panning with antigen B. When the phage library is in the form of antibodies presented on host cell surfaces, expression vectors harboring light chains that constitute the desired antibodies are collected from cells that present these antibodies, and purified by known techniques as necessary. By screening light chains against antigen A and antigen B as described above, commonly shared light chains that correspond to different heavy chains and show high affinity towards various antigens can be screened (Fig. 2).

Furthermore, commonly shared light chains with high selectivity can be screened by repeating infection/introduction into hosts that secrete antibodies (such as Fd) against antigen A and antigen B, secretion/presentation of antibodies (or antibody fragments corresponding to the light chains and heavy chains used, such as Fab), and panning/selection as necessary. Furthermore, by expanding the types of antigens to be screened, commonly shared light chains that correspond to a larger number of heavy chains and show high affinity towards various antigens can be screened. Light chains selected in this manner and genes encoding the light chains can be utilized for the production of multi-specific antibodies including BsAbs, which are useful in various diagnostic and therapeutic methods.

#### Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a schematic diagram of the Fab Lch library.

Fig. 2 is a schematic diagram that demonstrates steps taken in the present invention's

methods of screening for commonly shared light chains that correspond to different heavy chains and show high affinity.

Industrial Applicability

- 5           The methods of the present invention enable screening of commonly shared light chains that correspond to different heavy chains and show high affinity. Multi-specific antibodies can be efficiently expressed by utilizing the method of this invention.

## CLAIMS

1. A method of screening for commonly shared light chains, wherein the method comprises the steps of:
  - 5 (a) generating a host secreting the heavy chain of an antibody that binds to a desired antigen;
  - (b) introducing an antibody light chain library into the host of step (a) to cause secretion of phage libraries presenting antibodies composed of the heavy chain and the light chains;
  - (c) selecting a phage library that displays antibodies that bind specifically to the desired  
10 antigen of step (a);
  - (d) introducing the phage library selected in step (c) into a host secreting the heavy chain of an antibody that binds to a desired antigen different from the antigen of step (a) to cause secretion of phage libraries presenting antibodies composed of the heavy chains and light chains; and
  - 15 (e) selecting a phage library that displays antibodies that bind specifically to the desired antigen of step (d).
2. A method of screening for commonly shared light chains, wherein the method comprises the steps of:
  - 20 (a) generating a host secreting the heavy chain of an antibody that binds to a desired antigen;
  - (b) introducing an antibody light chain library into the host of step (a) to cause secretion of phage libraries presenting antibodies composed of the heavy chain and the light chains;
  - (c) selecting a phage library that displays antibodies that bind specifically to the desired  
25 antigen of step (a);
  - (d) introducing the phage library selected in step (c) into a host secreting a heavy chain comprising an amino acid sequence different from that of the heavy chain of step (a) to cause secretion of phage libraries that display antibodies composed of the heavy chains and light chains; and
  - 30 (e) selecting a phage library that displays antibodies that bind specifically to the antigen recognized by the heavy chain of step (d).
3. The method of claim 1 or 2, wherein the antibody heavy chain is Fd and the antibody composed of said heavy chains and light chains is Fab.  
35
4. The method of claim 1 or 2, wherein the host is *E. coli*.



5. The method of claim 1 or 2, wherein steps (b) to (e) are repeated twice or more.
6. The method of claim 1, wherein the method further comprises the following steps of:
- 5 (f) introducing the phage library selected in step (e) into a host secreting the heavy chain of an antibody that binds to a desired antigen different from the antigens of steps (a) and (d) to cause secretion of phage libraries that display antibodies composed of the heavy chains and light chains; and
- 10 (g) selecting a phage library that displays antibodies that bind specifically to the desired antigen of step (f).
7. The method of claim 2, wherein the method further comprises the following steps of:
- (f) introducing the phage library selected in step (e) into a host secreting a heavy chain comprising an amino acid sequence different from those of the heavy chains of steps (a) and (d)
- 15 to cause secretion of phage libraries that display antibodies composed of the heavy chains and light chains; and
- (g) selecting a phage library that displays antibodies that bind specifically to the antigen recognized by the heavy chain of step (f).
- 20 8. A light chain obtained by the method of any one of claims 1 to 7.
9. An antibody comprising the light chain of claim 8.
10. A method for generating antibody light chains, wherein the method comprises the steps of:
- 25 (a) selecting an antibody light chain from the screening method of any one of claims 1 to 7;
- (b) generating a vector capable of expressing the selected light chain based on its genetic sequence;
- (c) introducing the vector into a host cell; and
- 30 (d) culturing said host cell.
11. A host that is infected with a phage capable of presenting a light chain and comprises a vector capable of expressing a heavy chain.
- 35 12. An *E. coli* that is infected with a phage capable of presenting a light chain and comprises a vector capable of expressing a heavy chain.

## ABSTRACT

The present invention relates to methods of screening for commonly shared light chains, in which the method comprises the steps of (a) generating a host secreting the heavy chain of an antibody that binds to a desired antigen; (b) introducing an antibody light chain library into the host of step (a) to generate libraries presenting antibodies composed of the heavy chain and the light chains; (c) selecting a library presenting antibodies that bind specifically to the desired antigen of step (a); (d) introducing the library selected in step (c) into a host secreting the heavy chain of an antibody that binds to a desired antigen different from the antigen of step (a) to generate libraries that display antibodies composed of the heavy chains and light chains; and (e) selecting a library that displays antibodies that bind specifically to the desired antigen of step (d).

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 8 月 5 日 (05.08.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/065611 A1

(51) 国際特許分類:  
C12N 1/21, C07K 16/00 // C12N 15/09

C12P 21/08,

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000496

(22) 国際出願日: 2004 年 1 月 21 日 (21.01.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-012648 2003 年 1 月 21 日 (21.01.2003) JP

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小嶋 哲郎 (KOJIMA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING LIGHT CHAIN OF ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗体の軽鎖スクリーニング方法

(57) Abstract: A method of screening a common light chain which comprises: (a) the step of producing a host secreting the heavy chain of an antibody binding to a desired antigen; (b) the step of transferring an antibody light chain library into the host of the step (a) and thus producing libraries presenting antibodies consisting of the above heavy chain and the above light chain; (c) selecting a library presenting an antibody binding specifically to the desired antigen as described in the step (a); (d) the step of transferring the library selected in the step (c) into a host secreting the heavy chain of an antibody binding to a desired antigen, which is different from the antigen of the step (a), and thus producing libraries presenting antibodies consisting of the heavy chain and the light chain; and (e) selecting a library presenting an antibody binding specifically to the desired antigen as described in the step (d).

(57) 要約: 本発明は、(a) 所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主を製造する工程、(b) 抗体軽鎖ライブラリーを工程(a)の宿主に導入し、前記重鎖及び前記軽鎖により構成される抗体を提示するライブラリーを製造する工程、(c) 工程(a)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するライブラリーを選択する工程、(d) 工程(c)において選択されたライブラリーを工程(a)の抗原とは異なる所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主に対して導入し、該重鎖及び軽鎖により構成される抗体を提示するライブラリーを製造する工程、及び(c)工程(d)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するライブラリーを選択する工程を含む共通軽鎖をスクリーニングする方法に関する。



WO 2004/065611 A1

## 明細書

## 抗体の軽鎖スクリーニング方法

## 5 技術分野

本発明は、多重特異性抗体の異なる特異性を有する重鎖に対応して高いアフィニティーを示す共通軽鎖をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

- 10 二重特異性抗体(bispecific antibody;BsAb)は、二機能性抗体(bifunctional antibody)と呼ばれることもあり、2つの抗原決定基に特異的な結合部位を有する、2種類の抗原と反応することができる多価抗体である。BsAbは、ハイブリッドハイブリドーマ、即ちクアドローマ(quadroma)と呼ばれる2種類の異なるモノクローナル抗体産生細胞の融合体を用いて産生することができる(米国特許第4,474,8
- 15 93号公報; R. Bos and W. Nieuwenhuitzen (1992) Hybridoma 11(1): 41-51)。  
また、2種類のモノクローナル抗体のFab(抗原結合性)断片、またはFab'断片を化学的(M. Brennan et al. (1985) Science 229(1708): 81-3)、または遺伝子操作により結合して作製することもできる。さらに、2つの完全なモノクローナル抗体を共有結合することにより作製することもできる(B. Karpovsky et al.
- 20 (1984) J. Exp. Med. 160(6): 1686-701)。

- BsAb製造方法における問題点として、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖が無作為に組み合わせるため、10種類の異なる抗体分子が産生される可能性がある点が挙げられる(M. R. Suresh et al. (1986) Methods Enzymol. 121: 210-28)。クアドローマにより産生される10種類の抗体のうち、所望の二特異性を有する抗体は、
- 25 正しい軽鎖と重鎖が組合されており、且つ、異なる結合特性を有する2組の軽鎖・重鎖ペアにより構成された1種類の抗体のみである。そこで、クアドローマ

により產生される10種類の抗体から所望の二重特異性を有する抗体を選択的に精製する必要がある。精製は、一般にアフィニティークロマトグラフィーを利用して行われるが、余計な手数を要し、またその収量も少なくなってしまうという問題点がある(Y. S. Massimo et al. (1997) J. Immunol. Methods 201: 57-66)。

- 5      このような問題点を解消し、より大きな収量でBsAbを得る方法として、例えば、Fab'-チオニトロ安息香酸(TNB)誘導体とFab'-チオール(SH)等の抗体断片を化学的に連結する方法が知られている(Brennan et al. (1985) Science 229: 81)。さらに、化学的に連結させることができるFab'-SH断片をより簡便に得るための方法として、大腸菌等の宿主から遺伝子組換技術により產生する方法が知られて
- 10    いる(Shalaby et al. (1992) J. Exp. Med. 175: 217-25)。遺伝子組換技術を用いることにより、ヒト化抗体断片より構成されるBsAbを得ることもできる。また、ダイアボディ(Db)は、遺伝子融合により構築された軽鎖可変領域(VL)と重鎖可変領域(VH)が互いに結合できないくらいに短いリンカーによって結合されている2種類の断片からなるBsAbである(P. Holliner et al. (1993) Proc. Natl. Ac
- 15    ad. Sci. USA 90: 6444-8; EP404, 097号; W093/11161号)。このようなDbをさらに改良したものとして単鎖(single chain)Dbを挙げることができる(特願2002-112369号公報)。しかしながら、抗体断片は、完全長の抗体に比べ血清半減期が短く、完全抗体のようにエフェクター機能も有していない。そのため、完全長の抗体の方が、より診断や治療に適している場合があると考えられている。
- 20    產生された抗体重鎖をヘテロダイマーとして効率的に結合するための方法として、抗体重鎖のマルチマー化ドメインのCH3(定常領域の一部)ドメインに立体的に相補的な変異を導入する方法が知られている(Ridgway et al. (1996) Protein Eng. 9: 617-21)。この方法により製造された重鎖も、依然として誤った軽鎖と対形成し得る。そこで、特許文献1には、抗体結合ドメインを有するヘテロマー
- 25    性ポリペプチドと結合した共通の軽鎖を有する多重特異性抗体を製造する方法が記載されている。

2つの異なる抗原に対する特異的結合能を有するBsAbは、*in vitro*及び*in vivo*における免疫診断、治療及び免疫学的検定等の臨床分野において標的化薬剤として有用である。例えば、BsAbの一方の腕を酵素免疫分析に使用する酵素上の酵素反応を阻害しない部分のエピトープと結合するように、そして他方の腕を固定化用担体に結合するように設計してやることで、担体上に酵素を結合する媒体として使用することができる(Hammerling et al. (1968) J. Exp. Med. 128: 1461-73)。その他、例えば、抗体ターゲティング化血栓溶解療法を挙げることができる。該療法として、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター、プロウロキナーゼ等の酵素またはその前駆体等の蛋白を、血栓に含まれるフィブリン特異的に運搬する抗体を用いることが検討されている(T. Kurokawa et al. (1989) Bio/Technology 7: 1163; 特開平5-304992号公報)。さらに、癌ターゲティングに応用可能なマウス・ヒト・キメラ二重特異性抗体(特開平2-145187号公報)、種々の腫瘍を対象とした癌治療及び診断(例えば、特開平5-213775号公報;特開平10-165184号公報;特開平11-71288号公報; 特表2002-518041号公報;特表平11-506310号公報; Link et al. (1993) Blood 81: 3343; T. Nitta et al. (1990) Lancet 335: 368-71; L. deLeij et al. (1990) Foundation Nationale de Transfusion Sanguine, Les Ulis France 249-53; Le Doussal et al. (1993) J. Nucl. Med. 34: 1662-71; Stickney et al. (1991) Cancer Res. 51: 6650-5参照)、真菌治療(特開平5-199894号公報)、免疫応答誘導(特表平10-511085号公報;Weiner et al. (1993) Cancer Res. 53: 94-100)、T細胞殺細胞作用の誘導(Kroesen et al. (1994) Br. J. Cancer 70: 652-61; Weiner et al. (1994) J. Immunol. 152: 2385)、免疫分析(M.R. Suresh et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7989-93;特開平5-184383号公報)、免疫組織化学(C. Milstein and A.C. Cuello (1983) Nature 305: 537)等にBsAbを使用することが報告されている。

抗体の抗原特異性を決定する重鎖及び軽鎖の可変領域塩基配列を取得すること

により、特定の抗原に特異的な抗体を遺伝子工学的に作製することができる(J. Xiang et al. (1990) Mol. Immunol. 27: 809; C.R. Bebbington et al. (1992) Bio/Technology 10: 169)。抗原特異的な重鎖及び軽鎖を取得する方法として、大腸菌を宿主とし、ファージまたはファージミドを利用した方法が公知である(W. D. Huse et al. (1989) Science 246: 1275; J. McCafferty et al. (1990) Nature 348: 552; A.S. Kang et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4363)。これらの方法ではFabを産生させて抗体ライブラリーとするか、または、Fab若しくは一本鎖Fvとファージコート蛋白質との融合蛋白質を産生させて抗体ライブラリーとする。最終的に、抗原との結合性を調べることにより、それらの抗体ライブラリーから抗原特異的抗体及びその遺伝子を選択する。

〔特許文献1〕特表2001-523971号公報

#### 発明の開示

二重特異性IgGの作製では、異なる抗原に対する2つの抗体を選択し、その2つの重鎖遺伝子、2つの軽鎖遺伝子を細胞に導入することになるが、その組み合わせは上記従来技術においても述べたように10通りにもものぼる。そして特許文献1では、IgGのCH3部分にアミノ酸置換を導入することで重鎖のヘテロな組合せのものを優先的に発現する方法を開発し、さらに軽鎖を共通のものにすることで効率良く二特異性IgGの発現を行うことが提案されている。しかし任意の抗体を2つ選んだ場合、同じ軽鎖を含む可能性は低く、上記アイデアを実行することは困難である。本発明は、任意の異なる重鎖に対応し高いアフィニティーを示す共通軽鎖をスクリーニングする方法を提供する。

本発明者らは、BsAbの作成に利用可能な異なる重鎖に対応し、抗原に対し高いアフィニティーを示す共通軽鎖を、(1)抗原Aに対する抗体A、及び抗原Bに対する抗体Bをそれぞれ選択し、(2)該抗体の重鎖(好ましくはFd部分、即ちVH及びCH1を含む領域)をコードする遺伝子の発現ベクターを導入して各重鎖の分泌株Ha(抗体

Aの重鎖を分泌)及びHb(抗体Bの重鎖を分泌))を用意し、(3)別に、軽鎖がファージの表面蛋白との融合蛋白質として発現されるライブラリーを構築し、(4)該軽鎖ライブラリーを前記大腸菌Haに導入して抗体Aの重鎖と様々な軽鎖から成る抗体(重鎖がFd部分の場合はFab)を表面に提示したファージライブラリーを分泌させ(図1)、(5)該ライブラリーから、抗原Aによるパニングにてクローンを濃縮し、(6)得られたクローンをさらに大腸菌Hbに感染させ、抗体Bの重鎖と様々な軽鎖から成る抗体(重鎖がFd部分の場合はFab)を表面に提示したファージライブラリーを得、(7)該ライブラリーを抗原Bによるパニングによってクローンを濃縮するという工程を繰り返すことによって(図2)得ることができることに想到し、本発明を完成した。

より詳細には、本発明は、下記発明に関するものである。

(1)以下の工程を含む共通軽鎖をスクリーニングする方法。

- (a) 所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主を製造する工程
- (b) 抗体軽鎖ライブラリーを工程(a)の宿主に導入し、前記重鎖及び前記軽鎖により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程
- (c) 工程(a)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するファージライブラリーを選択する工程
- (d) 工程(c)において選択されたファージライブラリーを、工程(a)の抗原とは異なる所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主に対して導入し、該重鎖及び軽鎖により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程
- (e) 工程(d)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するファージライブラリーを選択する工程

(2)以下の工程を含む共通軽鎖をスクリーニングする方法。

- (a) 所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主を製造する工程
- (b) 抗体軽鎖ライブラリーを工程(a)の宿主に導入し、前記重鎖及び前記軽鎖



## 6

- により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程
- (c) 工程(a)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するファージライブラリーを選択する工程
- (d) 工程(c)において選択されたファージライブラリーを、工程(a)の重鎖とは異なるアミノ酸配列を有する重鎖を分泌する宿主に対して導入し、該重鎖及び軽鎖により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程
- 5 (e) 工程(d)記載の重鎖が認識する抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するファージライブラリーを選択する工程
- 10 (3) 抗体重鎖がFdであり、重鎖及び軽鎖により構成される抗体がFabである、上記(1)または(2)記載の方法。
- (4) 宿主が大腸菌である、上記(1)または(2)記載の方法。
- (5) 工程(b)から(e)を2回以上繰り返す、上記(1)または(2)記載の方法。
- (6) 以下の工程をさらに含む、上記(1)記載の方法。
- 15 (f) 工程(e)において選択されたファージライブラリーを、工程(a)及び(d)の抗原とは異なる所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主に対して導入し、該重鎖及び軽鎖により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程
- (g) 工程(f)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するファージライブラリーを選択する工程
- 20 (7) 以下の工程をさらに含む、上記(2)記載の方法。
- (f) 工程(e)において選択されたファージライブラリーを、工程(a)及び(d)の重鎖とは異なるアミノ酸配列を有する重鎖を分泌する宿主に対して導入し、該重鎖及び軽鎖により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程
- 25 (g) 工程(f)記載の重鎖が認識する抗原に対して特異的に結合する抗体を提示

するファージライブラリーを選択する工程

(8) 上記(1)～(7)のいずれかの方法により得られた軽鎖。

(9) 上記(8)記載の軽鎖を含む抗体。

(10) 以下の工程を含む抗体の軽鎖の製造方法。

- 5       (a) 上記(1)～(7)のいずれかに記載のスクリーニング方法により抗体の軽鎖  
          を選択する工程
- (b) 選択された軽鎖の遺伝子配列を基に、該軽鎖を発現可能なベクターを作  
          製する工程
- (c) 該ベクターを宿主細胞に導入する工程
- 10       (d) 該宿主細胞を培養する工程
- (11) 軽鎖を提示可能なファージが感染し、かつ重鎖を発現可能なベクターを有す  
          る宿主。
- (12) 軽鎖を提示可能なファージが感染し、かつ重鎖を発現可能なベクターを有す  
          る大腸菌。
- 15       本発明は、(a) 所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主を製造  
          する工程、(b) 抗体軽鎖ライブラリーを工程(a)の宿主に導入し、前記重鎖及び  
          前記軽鎖により構成される抗体を提示するライブラリーを製造する工程、(c) 工  
          程(a)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するライブラリー  
          を選択する工程、(d) 工程(c)において選択されたライブラリーを工程(a)の抗原
- 20       とは異なる所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主に対して導入  
          し、該重鎖及び軽鎖により構成される抗体を提示するライブラリーを製造する工  
          程、及び(e) 工程(d)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示す  
          るライブラリーを選択する工程、を含む共通軽鎖をスクリーニングする方法に関  
          する。本発明の方法は、特にBsAbの作成に利用可能な異なる重鎖に対応し、抗原
- 25       に対し高いアフィニティーを示す共通軽鎖を選択するために利用することができ  
          る。しかしながら、上記本発明の方法において、工程(b)及び(c)、または工程

(b)から(e)をさらに異なる種類の重鎖を分泌する宿主及びそれに対応した抗原を用いて繰り返すことにより、BsAbのみならず、3種類以上の抗原に対して特異性を示す多重特異性抗体の作成に利用できる、より多くの重鎖に対応し、抗原に対して高いアフィニティーを示す共通軽鎖をスクリーニングして行うことができる。

- 5 本明細書中に記載される多重特異性抗体とは、少なくとも2種類の異なる抗原に対して特異的に結合することができる抗体である。好ましい多重特異性抗体として2つの抗原に対して特異的に結合することができるBsAbを挙げることができる。

- 本発明において、「異なる抗原」とは必ずしも抗原自体が異なる必要はなく、抗原決定基が異なる場合等も本発明の「異なる抗原」に含まれる。従って、例えば、単一分子内の異なる抗原決定基も本発明の異なる抗原に含まれ、このような単一分子内の異なる抗原決定基を各々認識する2つの抗体は、本発明において異なる抗原を認識する抗体として扱われる。また、本発明において「共通軽鎖」とは、異なる2種以上の重鎖と会合し、それぞれの抗原に対して結合能を示し得る軽鎖である。ここで、「異なる重鎖」とは、好ましくは異なる抗原に対する抗体
- 10 の重鎖を指すが、それに限定されず、アミノ酸配列が互いに異なっている重鎖を意味する。従って、本発明は、(a) 所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主を製造する工程、(b) 抗体軽鎖ライブラリーを工程(a)の宿主に導入し、前記重鎖及び前記軽鎖により構成される抗体を提示するライブラリーを製造する工程、(c) 工程(a)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示
- 15 するライブラリーを選択する工程、(d) 工程(c)において選択されたライブラリーを工程(a)の重鎖とは異なるアミノ酸配列を有する重鎖を分泌する宿主に対して導入し、該重鎖及び軽鎖により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程、並びに(e) 工程(d)記載の重鎖が認識する抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するファージライブラリーを選択する工程、を含む共通
- 20 軽鎖をスクリーニングする方法にも関する。
- 25

本発明は、2種類以上の異なる抗体の重鎖に対応し、抗原に対し高いアフィニ

ティーを示す共通軽鎖をスクリーニングする方法に関するものである。本発明のスクリーニング方法では、まず、所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主を得る必要がある。該宿主は、例えば、BsAbを作成する場合には、所望の2種類の抗原の各々に対応する重鎖を分泌する2種類の宿主が必要であり、3特異性抗体であれば3種類、4特異性抗体であれば4種類必要となる。以下、例示的にBsAbにおける共通重鎖をスクリーニングするための方法を中心として説明する。

本発明のスクリーニングに必要な抗体重鎖を分泌する宿主を得るため、まず、2種類の抗原(便宜的に、抗原A及び抗原Bとする)に対する抗体を選択し、それらを産生する細胞を取得する。以後の説明において抗原Aに対する抗体を抗体A、抗原Bに対する抗体を抗体Bと呼ぶ。これらの抗体産生細胞は、適当な感作抗原を用いて動物を免疫化することにより得ることができる。または、抗体を産生し得るリンパ球を *in vitro* で免疫化して抗体産生細胞とすることもできる。免疫化する動物としては、各種哺乳動物を使用できるが、ゲッ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が一般的に用いられる。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等の霊長目の動物を例示することができる。その他、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物も知られており、このような動物を使用することによりヒト抗体を得ることもできる(W096/34096; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15: 146-56参照)。

動物の免疫化は、感作抗原をPhosphate-Buffered Saline(PBS)または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じてアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を4〜21日毎に数回投与する。抗体の産生の確認は、動物の血清中の目的とする抗体力価を慣用の方法により測定することにより行われ得る。

動物を免疫化する抗原としては、免疫原性を有する完全抗体と、免疫原性を有

## 10

さない不完全抗原(ハプテンを含む)のどちらかを利用することができる。例えば、蛋白質、ポリペプチド、多糖類、核酸、脂質等からなる物質を抗原として使用することができる。動物を免疫するのに用いる免疫原としては、必要に応じ、抗原となる分子を他の分子(例えば、キーホルリンペットヘモシアニン、血清アルブ

5 ミン、ウシサイクログロブリン、ダイズトリブシン阻害剤等)に結合させて可溶性抗原とすることもできる。さらに、場合により、該可溶性抗原の断片を免疫原として利用してもよい。受容体等の膜貫通分子を抗原として用いる場合には、好ましくは、これらの断片(例えば、受容体の細胞外領域)を使用する。また、膜貫通分子を細胞表面上に発現する細胞を免疫原としてもよい。このような細胞とし

10 ては、天然(腫瘍セルライン等)由来の細胞も存在するが、遺伝子組換技術により膜貫通分子を発現する細胞を調製してもよい。

本発明の共通鎖を選択する方法は、多様な抗原に対するBsAbを製造するのに適用できるものである。例えば、BsAbを癌治療において使用することを目的とする場合には、例えば、抗体の一方の腕は腫瘍細胞抗原を認識するように調製し、

15 他方の腕は細胞傷害性を誘起する分子を認識するように設計することができる。腫瘍細胞抗原としては、例えば、1D10(悪性B細胞)、AMOC-1(pan carcinoma associated antigen)、CAMA1、CD7、CD15、CD19、CD22、CD38、CEA、EGF受容体、Id-1、L-D1(大腸癌)、MoV18、p97、p185<sup>HER2</sup>、OVCAR-3、神経細胞接着分子(neural cell adhesion molecule; NCAM)、腎細胞癌、メラノサイト刺激ホルモンアナログ、葉酸結合蛋白質(FBP)等が挙げられる。また、細胞傷害性を誘起する分子と

20 しては、CD3、CD16、Fc $\gamma$ RIが例示される。その他、IFN- $\alpha$ 、サポニン、ピンカアルカロイド、リシンのA鎖等の毒素と結合できるようBsAbを設計することもできる。

また、ヘテロ二量体を形成し、リガンドとの結合によりその鎖間の距離または

25 角度等が変化することにより細胞内にシグナルを伝達する受容体(例えば、多くのサイトカイン受容体)に対して結合するようにBsAbを構築することにより、該B

sAbはリガンドによる受容体の二量体化を模倣できるアゴニスト抗体として利用することができる。

その他にも、(1)CD30及びアルカリホスファターゼに結合し、リン酸マイトマイシンをマイトマイシンアルコールに変換する等の、化学物質の変換を助ける酵素と相互作用するBsAb、(2)繊維素溶解剤として使用できる、フィブリン、tPA、uPA等に結合するBsAb、(3)LDL及びFc受容体( $Fc\gamma RI$ 、 $Fc\gamma RII$ 、または $Fc\gamma RIII$ )等に結合し免疫複合体を細胞表面受容体へ誘導するBsAb、(4)CD3等のT細胞上の抗原と、HCV、インフルエンザ、HIV等の病原菌の抗原を認識する感染性の疾患に使用できるBsAb、(5)腫瘍の検出に使用し得る腫瘍抗原と、EOTUBE、DPTA、ハプテン等の検出可能な物質に結合性を有するBsAb、(6)ワクチンアジュバントとして使用し得るBsAb(Fanger et al. (1992) Crit. Rev. Immunol. 12: 101-24参照)、並びに(7)診断において使用し得るウサギIgG、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、FITC、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ等の検出可能な物質と、ホルモン、フェリチン、ソマトスタチン、サブスタンスP、CEA等を抗原とするBsAb等が知られている。本発明の共通軽鎖を選択する方法は、これらの公知のBsAbを含む多様な多重特異性抗体の製造(W089/02922号パンフレット、EP314、317号公報、US5116964号公報参照)において利用することができる。

次に、所望の抗原で免疫化した動物またはリンパ球より得られた抗体産生細胞を、慣用の融合剤(例えば、ポリエチレングリコール)を使用してミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作成する(Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 59-103)。必要に応じハイブリドーマ細胞を培養・増殖し、免疫沈降、放射免疫分析(RIA)、酵素結合免疫吸着分析(ELISA)等の公知の分析法により該ハイブリドーマより産生される抗体の結合特異性を測定する。その後、必要に応じ、目的とする特異性、親和性または活性が測定された抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法等の手法によりサブクローニングすることもできる。

## 1 2

続いて、選択された抗体A及び抗体Bの重鎖をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞(感作リンパ球等)から、重鎖に特異的に結合し得るプローブ(例えば、抗体定常領域をコードする配列に相補的なオリゴヌクレオチド等)を用いてクローニングする。また、mRNAからRT-PCRによりクローニングすることも可能である。免疫グロブリンは、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMの5つの異なるクラスに分類される。さらに、これらのクラスは幾つかのサブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG-1、IgG-2、IgG-3、及びIgG-4; IgA-1及びIgA-2等)に分けられる。本発明において使用する抗体重鎖は、これらいずれのクラス及びサブクラスに属するものであってもよく、特に限定されないが、IgGは特に好ましいものである。

10 上述のハイブリドーマに代えて抗体ライブラリーから所望の抗原との結合性を利用して、目的とする抗体または抗体断片をコードする遺伝子を取得することもできる。抗体ライブラリーの構築は周知であり、様々な方法により作成し、利用することができる。例えば、抗体ファージライブラリーについては、Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-8、Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 5  
15 81-97、Waterhouses et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21: 2265-6、Griffiths et al. (1994) EMBO J. 13: 3245-60、Vaughan et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 309-14、及び特表平10-504970号公報等の文献を参照することができる。その他、真核細胞をライブラリーとする方法(W095/15393号パンフレット)やリボソーム提示法などの公知の方法を用いることが可能である。

20 ここで、重鎖をコードする遺伝子を遺伝子工学的手法により改変することも可能である。遺伝子工学的に非ヒト哺乳動物(マウス、ラット、ハムスター等)由来のモノクローナル抗体のCDR(相補性決定領域)以外の部分をヒト免疫グロブリン由来の可変領域の枠組構造配列に置換し、「ヒト化抗体」とする技術が公知である(例えば、Jones et al. (1986) Nature 321: 522-5; Reichmann et al. (198  
25 8) Nature 332: 323-9; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-6参照)。ヒト化抗体は、レシピエント抗体に導入されたCDRまたは枠組構造配列のど

## 1 3

ちらにも含まれないアミノ酸残基を含んでいてもよい。通常、このようなアミノ酸残基の導入は、抗体の抗原認識及び/または結合能力をより正確に至適化するために行われる。本発明の方法のスクリーニングに使用する重鎖は、このようなヒト化等の改変されたものであってもよい。

- 5 上述のヒト化以外に、例えば、抗原との結合性等の抗体の生物学的特性を改善するために改変を行うことも考えられる。このような改変は、部位特異的突然変異(例えば、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488参照)、PCR変異、カセット変異等の方法により行うことができる。一般に、生物学的特性の改善された抗体変異体は70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上(例えば、95%以上、97%、98%、99%等)のアミノ酸配列相同性及び/または類似性を元となった抗体重鎖の可変領域のアミノ酸配列に対して有する。本明細書において、配列の相同性及び/または類似性は、配列相同性が最大の値を取るように必要に応じ配列を整列化、及びギャップ導入した後、元となった抗体残基と相同(同じ残基)または類似(一般的なアミノ酸の側鎖の特性に基き同じグループに分類されるアミノ酸残基)するアミノ酸残基の割合として定義される。
- 10 通常、天然のアミノ酸残基は、その側鎖の性質に基いて(1)疎水性：アラニン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、メチオニン及びロイシン；(2)中性親水性：アスパラギン、グルタミン、システイン、スレオニン及びセリン；(3)酸性：アスパラギン酸及びグルタミン酸；(4)塩基性：アルギニン、ヒスチジン及びリシン；(5)鎖の配向に影響する残基：グリシンおよびプロリン；ならびに(6)芳香族性：チロシン、トリプトファン及びフェニルアラニンのグループに分類される。
- 15

- 本発明の方法において用いる抗体重鎖を分泌する宿主細胞は、抗体の重鎖の全長を分泌するものでも、重鎖の一部の断片を分泌するものであってもよい。従って、本発明の重鎖とは、抗体重鎖の全長、及び重鎖の断片が含まれる。重鎖の断片は、特に限定されないが、重鎖可変領域を含む断片であることが好ましく、特
- 25



に好ましくはFd部分(重鎖の可変領域(VH)及び定常領域(CH1))を含む断片である。しかしながら、特にこれに限定されるものではなく、重鎖の可変領域のみ、可変領域の一部、または定常領域のその他の領域(CH2及び3)を含む部分を分泌する構成としてもよい。

- 5 所望の抗体重鎖をコードする遺伝子部分を、適当な宿主細胞における発現に適した発現ベクターに導入する。本発明の方法では、重鎖を分泌する宿主細胞は特に限定されるものではないが、ファージを感染させることができる細菌、特にグラム陰性細菌が好ましく、中でも、F因子を発現する大腸菌が好ましい。F因子を発現する大腸菌としては、例えば、XL1-Blueを挙げることができる。
- 10 本発明の方法において特に好ましい、重鎖を大腸菌で発現させるためのベクターは、遺伝子情報の転写及び翻訳を制御するプロモーター、ターミネーター等のユニットを含む必要がある。例えば、プラスミドベクターとして、pBR、pUC系プラスミドを利用することができる。プロモーターとしては、lac、trp、tac、 $\lambda$ ファージPL、PR等に由来するプロモーターが利用可能である。ターミネーターとしては、trpA、ファージ、rrnBリボソームRNA由来のものを使用することができる。
- 15

構築した発現ベクターは宿主細胞へ導入し、各抗体の重鎖を分泌する株を取得する。発現ベクターは、カルシウムイオンを用いた方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110 (1972))、プロトプラスト法(特開昭63-24829号公報)、エレクト

20 ポーレーション法(Gene 17: 107 (1982); Molecular&General Genetics 168: 111 (1979))等の方法により宿主細胞へ導入され得る。

- 本発明のスクリーニング方法においてスクリーニングの対象となる抗体軽鎖のプールは、重鎖を分泌する宿主として細菌を選択した場合には、ファージライブラリーの形態とするのが好ましい。軽鎖をコードする遺伝子としては、ヒトまた
- 25 はその他の動物の末梢血単核球、骨髓、または脾臓調製物由来のRNAを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)等により増幅して得られた遺伝子群、合成DNA等を

利用することができる。その他、抗体のCDR領域内に変異を誘発して抗体ライブラリーの多様性を高める方法も知られている(特表平10-504970号公報)。このような方法により多様性を高められた抗体軽鎖遺伝子ライブラリーを本発明のスクリーニング方法における軽鎖をコードする遺伝子のプールとして使用することも  
5 できる。本発明の軽鎖には、軽鎖の全長、及び軽鎖の一部の断片が含まれる。軽鎖の断片とは、特に限定されないが、軽鎖可変領域(VL)を含む断片であることが好ましい。

ファージライブラリーを作製するため、通常、軽鎖をコードするDNAを、該軽鎖が外表面蛋白質またはディスプレイアンカー蛋白質との融合蛋白質としてファージ外表面へ提示されるように適当なファージベクターに組込む。ここで、ファージベクターは特に限定されないが、通常、バクテリオファージ用の複製開始点(ori)を含む、ファージゲノムの修飾により誘導されるベクターである。ファージベクターは、好ましくは、N末からC末の方向で(1)軽鎖、及び(2)ファージ膜アンカードメイン(外表面蛋白質またはディスプレイアンカー蛋白質の全部若しくは一部)をコードしている。また、必要に応じ、上記(1)及び(2)によりコードされる蛋白質が、宿主細菌の細胞外へ分泌されバクテリオファージに取込まれることを可能とする原核細胞分泌シグナルドメインをコードする配列を(1)の軽鎖をコードする配列の前に有している。  
10 15

軽鎖をファージ粒子表面上に提示させるためのファージ膜アンカードメインは、糸状ファージ粒子の外膜と結合することができ、それにより融合蛋白質を取り込ませることができる外表面蛋白質またはディスプレイアンカー蛋白質の全部または一部である。外表面蛋白質またはディスプレイアンカー蛋白質とは、成熟ファージ粒子をコートする蛋白質であり、例えば、ファージ粒子のメジャーコート蛋白質であるcpVIIIや、それ以外のマイナーなコート蛋白質であるcpVI、cpVII、cpIX、あるいは感染吸着蛋白質であるcpIII蛋白質を挙げることができる。特に、cpIIIまたはcpVIII蛋白質との融合蛋白質として発現させるのが好ましく、中で  
20 25

もcpIII蛋白質との融合蛋白質の発現はよく研究されている (Smith (1985) Science 228: 1315-7; de la Cruz et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 4318-22参照)。膜アンカードメインは、これらの成熟ファージ粒子をコートする蛋白質のC末領域の一部を含むものであり、脂質二重層膜を貫通するための疎水性アミノ酸残基の領域、及び、細胞質領域の荷電したアミノ酸残基の領域である。

分泌シグナルは、宿主細胞からの融合蛋白質の分泌を可能にするリーダーペプチド配列であればよく、pel1B分泌シグナルを例示することができる (Better et al. (1988) Science 240: 1041-3; Sastry et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5728参照)。

10 上述のようなファージベクターでは、通常、ファージ粒子の産生に必要なファージゲノム配列が除去または不活性化されている。そこで、該ファージベクターを宿主細菌に感染させてファージ粒子を産生させるために、一般的には、ヘルパーファージが必要とされる。ヘルパーファージは、欠損ファージまたはファージベクターを含む細胞に対して感染され、該欠損ファージまたはファージベクターを補足する機能を有する。

ファージライブラリーを構成するファージ粒子は特に限定されず、例えば、Charon4A、Charon30、f1、f2、fd、G4、If1、Ike、M13、MS2、P1、P2、P4、Pf1、Pf3、T4、T7、Xf、 $\lambda$ 、 $\lambda$ B、 $\lambda$ gWES、 $\Phi$ K、 $\Phi$ X174等の公知のファージを利用することができるが、好ましくはfd、f1、M13などの糸状ファージである。このよう  
20 にして作製されたライブラリーの個々のファージ粒子は、粒子表面上に提示される軽鎖融合蛋白質をコードする対応ファージミドのコピーを含む。従って、軽鎖提示ファージライブラリーに対して抗体Aの重鎖を接触させ、ファージ粒子上に提示される軽鎖融合蛋白質に該重鎖が会合したものを抗原Aに対する結合能によりファージ粒子を分離してくることにより抗体Aの重鎖と会合し、抗原Aに対する  
25 結合能を有する軽鎖をコードする遺伝子を得ることができる。

例えば、f1ファージのoriを含んだベクターを用いて、軽鎖(例えば、VL及びCL

を含むもの)がf1ファージのgene3蛋白(マイナーコート蛋白質)と融合蛋白として発現するライブラリーを構築する。この軽鎖ライブラリーを先に述べた抗体Aの重鎖(例えば、Fd)を発現する大腸菌宿主に導入し、ヘルパーファージを感染させることにより、gene3蛋白との融合蛋白として抗体Aの重鎖と様々な軽鎖から成る抗体(重鎖がFdであり、軽鎖がVL及びCLを含む場合にはFab)を表面に提示するファージライブラリーを大腸菌から分泌させることができる(図1)。

W095/15393号パンフレットには、抗体本来の抗原結合能をスクリーニング段階からより正確に調べることを可能にする抗体真核細胞ライブラリーの構築も提案されている。そこで、本発明の方法において、大腸菌等の細菌宿主に代えて、抗体を細胞表面上に提示する抗体真核細胞ライブラリーを採用することもできる。即ち、所望の重鎖(例えば、Fd)をコードする遺伝子を、該遺伝子の発現に適したプロモーター及び該重鎖を分泌可能なシグナル配列の下流に連結した発現ベクターを真核細胞宿主に導入する。そして、軽鎖をコードする遺伝子は、該軽鎖が発現された場合に細胞表面上に提示されるように細胞膜貫通領域をコードする配列と連結して、適当なプロモーターの下流へ挿入し、発現ベクターを構築する。好ましくは、該細胞膜貫通領域は、発現された軽鎖のC末端に付加される。該軽鎖発現ベクターを前記重鎖分泌宿主細胞へ導入することにより、所望の抗原に対して結合する抗体(重鎖としてFdを、そして軽鎖としてVL及びCLを含むものを使用した場合には、提示される抗体はFab断片となる)を細胞表面上に発現している宿主細胞を選択することもできる。

使用する宿主細胞の種類は特に限定されないが、抗体の正しい抗原特異性に基いたスクリーニングを目的とする場合には、真核生物細胞、特に動物細胞が好ましく、さらに哺乳動物細胞が好ましい。例えば、3T3、BHK、Bowesメラノーマ、C127、CHO(J. Exp. Med. 108: 945 (1995); Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968))、COS、HEK、Hela、KJM、Namalwa、ミエローマ細胞等を例示することができる。重鎖及び軽鎖を発現させるベクター

は、選択した宿主における発現に適したものであればよく、pUC18等を利用して構築することができる。重鎖をコードする遺伝子は、周知の技術によりゲノム上に組込むことも可能である。発現ベクターは、エレクトロポレーション法(Chu et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 1311-26)、カチオニックリポソーム法、  
5 直接注入法(マイクロインジェクション法)、電気穿孔法(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons (1987) Section 9.1-9.9)、リポフェクション法(Derijard (1994) Cell 7: 11025-37)、リン酸カルシウム法(Chen and Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7: 2745-52)、DEAEデキストラン法(Lopata et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 5707-17; Sussmann and Milman (1985) Mo  
10 l. Cell. Biol. 4: 1642-3)等の慣用の方法により宿主細胞へ導入する。

次に、本発明のスクリーニング法では、上述のようにして作製された抗体を提示する宿主細胞を抗原Aに対する結合性により選択する。宿主として細菌細胞を選択し、軽鎖をコードする遺伝子をファージライブラリーとした場合には、抗体はファージライブラリーとして宿主細胞より分泌される。従って、抗体Aに対する  
15 抗原Aによるパニングにて抗原Aに結合するクローンを宿主細胞より分泌されたファージライブラリーから濃縮することができる。この場合、濃縮された所望のファージライブラリーをそのまま次の工程における宿主細胞の感染に使用することができ、特に都合がよい。ファージライブラリーの分泌ではなく、宿主細胞表面に抗体が提示される形態とした場合には、所望の抗体を提示する細胞から該抗  
20 体を構成する軽鎖をコードする発現ベクターを回収し、必要に応じ公知の手段により精製して次の工程に用いる。

続いて、本発明のスクリーニング法では、上述のようにして濃縮されたクローン、または回収された軽鎖発現ベクターを、抗体Bの抗体(例えば、Fd)を分泌する宿主細胞に感染または導入する。ファージライブラリーを用いる場合には、該  
25 宿主細胞に対してヘルパーファージを再び重感染させることにより、抗体Bの重鎖(例えば、Fd)と様々な軽鎖から成る抗体(Fd並びにVL及びCLを含む軽鎖を使用

した場合にはFab)を表面に提示したファージライブラリーが分泌される。ファージベクター以外の発現ベクターを用いた場合には、細胞表面上に抗体Bの重鎖(例えばFd)と軽鎖から成る抗体(Fd並びにVL及びCLを含む軽鎖を使用した場合にはFab)を表面に提示した様々な細胞が得られる。

- 5 次に、抗原Aに対する選択と同様に、ファージライブラリーを用いた場合には、該ライブラリーに対する抗原Bによるパニングによって、宿主細胞より分泌されたファージライブラリーから抗原Bに結合するクローンを濃縮する。また、宿主細胞表面に抗体が提示される形態とした場合には、所望の抗体を提示する細胞から該抗体を構成する軽鎖をコードする発現ベクターを回収し、必要に応じ公知の
- 10 手段により精製する。以上のようにして、抗原A及び抗原Bに対する軽鎖のスクリーニングを行うことによって、異なる重鎖に対応し、種々の抗原に対して高いアフィニティーを示す共通軽鎖をスクリーニングすることができる(図2)。

- さらに、必要に応じ、抗原A及び抗原Bに対する抗体(例えばFd)を分泌する宿主への感染・導入、抗体(またはFab等の使用した軽鎖及び重鎖に応じた抗体断片)
- 15 の分泌・提示、並びにパニング・選択を繰り返すことによってより選択性の高い共通軽鎖をスクリーニングすることができる。また、スクリーニングする抗原の種類を増やすことによって、より多くの重鎖に対応し、種々の抗原に対して高いアフィニティーを示す共通軽鎖をスクリーニングすることも可能である。このようにして選択された軽鎖、及び軽鎖をコードする遺伝子は、様々な診断及び治療
- 20 方法において有用なBsAbを含む多重特異性抗体の製造に利用することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、Fab Lchライブラリーの模式図である。

- 図2は、本発明の異なる重鎖に対応し、高いアフィニティーを示す共通軽鎖の
- 25 スクリーニング方法の流れを示す模式図である。

産業上の利用の可能性

本発明の方法により、異なる重鎖に対応し、高いアフィニティーを示す共通軽鎖をスクリーニングすることが可能となった。本発明の方法を利用することにより、効率の良く多重特異性抗体の発現を行うことができる。

## 21

## 請求の範囲

## 1. 以下の工程を含む共通軽鎖をスクリーニングする方法。

- (a) 所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主を製造する工程
- 5 (b) 抗体軽鎖ライブラリーを工程(a)の宿主に導入し、前記重鎖及び前記軽鎖により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程
- (c) 工程(a)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するファージライブラリーを選択する工程
- 10 (d) 工程(c)において選択されたファージライブラリーを、工程(a)の抗原とは異なる所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主に対して導入し、該重鎖及び軽鎖により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程
- (e) 工程(d)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するファージライブラリーを選択する工程
- 15

## 2. 以下の工程を含む共通軽鎖をスクリーニングする方法。

- (a) 所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主を製造する工程
- (b) 抗体軽鎖ライブラリーを工程(a)の宿主に導入し、前記重鎖及び前記軽鎖により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程
- 20 (c) 工程(a)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するファージライブラリーを選択する工程
- (d) 工程(c)において選択されたファージライブラリーを、工程(a)の重鎖とは異なるアミノ酸配列を有する重鎖を分泌する宿主に対して導入し、該重鎖及び軽鎖により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程
- 25



## 2 2

(e) 工程(d)記載の重鎖が認識する抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するファージライブラリーを選択する工程

3. 抗体重鎖がFdであり、重鎖及び軽鎖により構成される抗体がFabである、請求項1または2記載の方法。

5 4. 宿主が大腸菌である、請求項1または2記載の方法。

5. 工程(b)から(e)を2回以上繰り返す、請求項1または2記載の方法。

6. 以下の工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

10 (f) 工程(e)において選択されたファージライブラリーを、工程(a)及び(d)の抗原とは異なる所望の抗原に対して結合する抗体の重鎖を分泌する宿主に対して導入し、該重鎖及び軽鎖により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程

(g) 工程(f)記載の所望の抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するファージライブラリーを選択する工程

7. 以下の工程をさらに含む、請求項2記載の方法。

15 (f) 工程(e)において選択されたファージライブラリーを、工程(a)及び(d)の重鎖とは異なるアミノ酸配列を有する重鎖を分泌する宿主に対して導入し、該重鎖及び軽鎖により構成される抗体を提示するファージライブラリーを分泌させる工程

20 (g) 工程(f)記載の重鎖が認識する抗原に対して特異的に結合する抗体を提示するファージライブラリーを選択する工程

8. 請求項1～7のいずれかの方法により得られた軽鎖。

9. 請求項8記載の軽鎖を含む抗体。

10. 以下の工程を含む抗体の軽鎖の製造方法。

25 (a) 請求項1～7のいずれかに記載のスクリーニング方法により抗体の軽鎖を選択する工程

(b) 選択された軽鎖の遺伝子配列を基に、該軽鎖を発現可能なベクターを

作製する工程

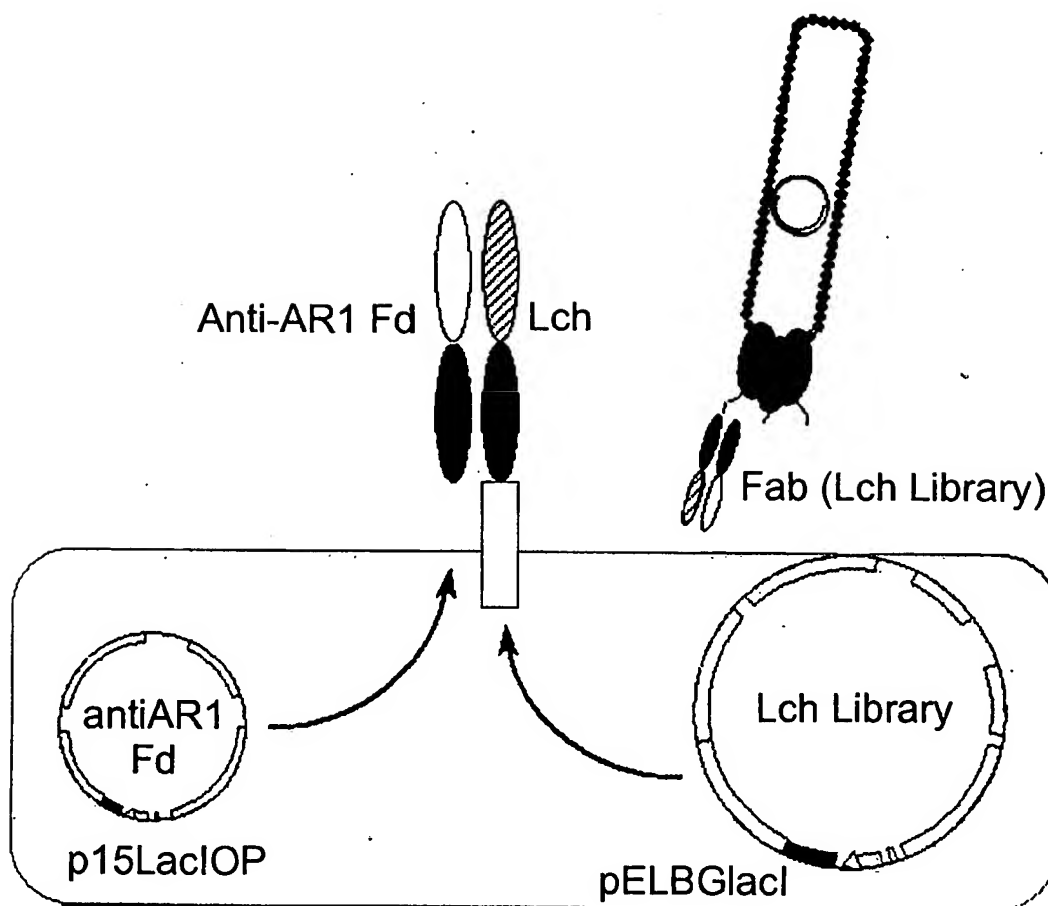
(c) 該ベクターを宿主細胞に導入する工程

(d) 該宿主細胞を培養する工程

- 1 1. 軽鎖を提示可能なファージが感染し、かつ重鎖を発現可能なベクターを  
5 有する宿主。
- 1 2. 軽鎖を提示可能なファージが感染し、かつ重鎖を発現可能なベクターを  
有する大腸菌。

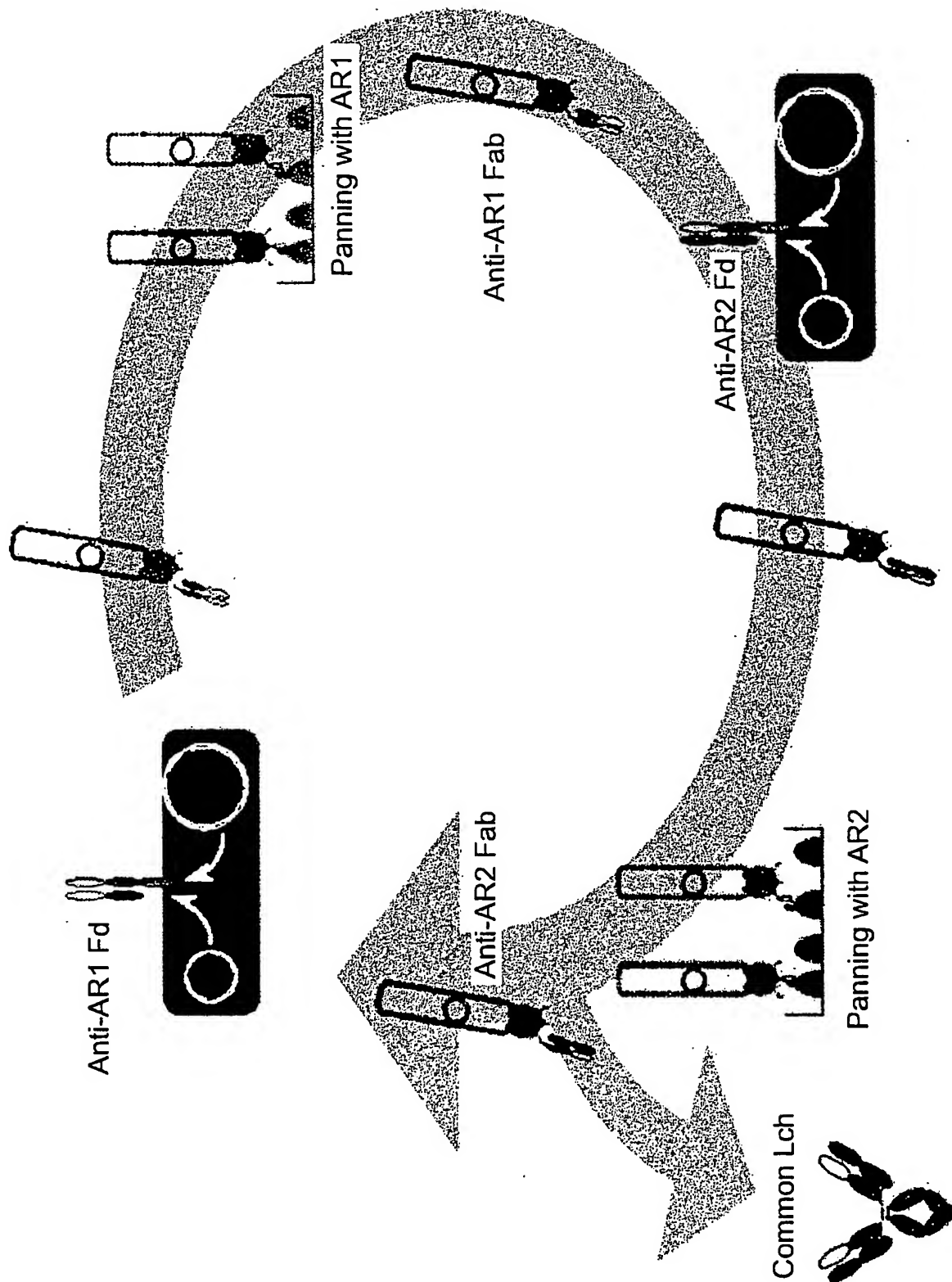
1 / 2

図 1



2 / 2

図 2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000496

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/08, C12N1/21, C07K16/00//C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/08, C12N1/21; C07K16/00//C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
PubMed

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A Y	Paul Carter, Bispecific human IgG by design., J. Immunol.Methods, 2001, Vol.248, pages 7 to 15	1-7,10-12 8,9
A Y	WO 98/50431 A2 (Genentech, Inc.), 12 November, 1998 (12.11.98), & EP 98/50431 A3 & JP 2001-523971 A	1-7,10-12 8,9
A Y	Merchant AM. et al., An efficient route to human bispecific IgG., Nat.Biotechnology., 1998, Vol.16, No.7, pages 677 to 681	1-7,10-12 8,9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 March, 2004 (17.03.04)Date of mailing of the international search report  
06 April, 2004 (06.04.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12P21/08, C12N1/21, C07K16/00 //C12N15/09		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12P21/08, C12N1/21, C07K16/00 //C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) PubMed		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A Y	Paul Carter, Bispecific human IgG by design., J Immunol Methods, 2001, Vol. 248, p. 7-15	1-7, 10-12 8, 9
A Y	WO 98/50431 A2 (Genentech, Inc.) 1998. 11. 12 & EP 98/50431 A3 & JP 2001-523971 A	1-7, 10-12 8, 9
A Y	Merchant AM. et al., An efficient route to human bispecific IgG., Nat Biotechnol., 1998, Vol. 16, No. 7, p. 677-681	1-7, 10-12 8, 9
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 17. 03. 2004	国際調査報告の発送日 06. 4. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明	4 B 3 2 2 8
	電話番号 03-3581-1101	内線 3448